

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-502723

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月23日

(51)Int.Cl.* C 07 K 14/79 A 61 K 38/16 C 12 N 5/10	識別記号 8318-4H	序内整理番号 F I
	8314-4C 9050-4B	A 61 K 37/14 C 12 N 15/00 ZNA A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平4-505865  
 (22)出願日 平成4年(1992)2月6日  
 (35)翻訳文提出日 平成5年(1993)8月6日  
 (86)国際出願番号 PCT/US92/00928  
 (87)国際公開番号 WO92/13550  
 (88)国際公開日 平成4年(1992)8月20日  
 (31)優先権主張番号 652,869  
 (32)優先日 1991年2月8日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(A.T., BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,  
 SE), CA, JP

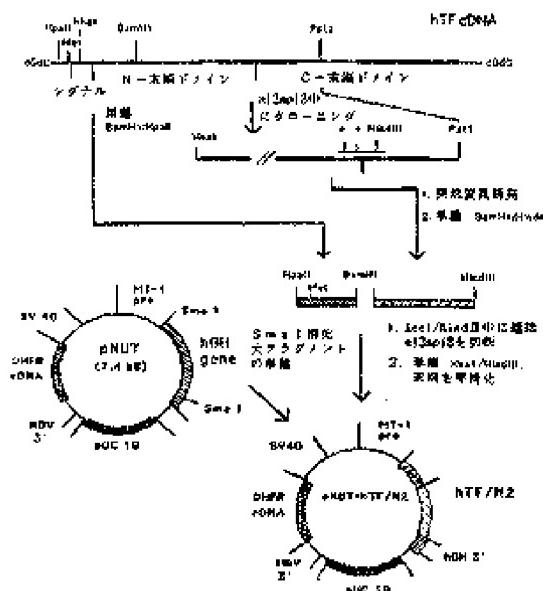
(71)出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・  
 アンド・ステイト・アグリカルチュラル・  
 カレッジ  
 アメリカ合衆国バーモント州05405/バーリ  
 ントン(番地なし)  
 (72)出願人 ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュコ  
 ロンビア  
 カナダ国ブリティッシュ・クイーンズ・ブ  
 リティッシュ・コロニア・バンクーバー  
 (番地なし)  
 (74)代理人弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及びそれらの突然変異体

## (57)【要約】

金属結合性が変えられた、又は他の性質を有する組み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター腎臓細胞などの安定な真核細胞系により機能的形態で発現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰負荷に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去する金属キレート化治療に用いることができる。



## 特　　許　　意

1. 細み替えトランスフェリン。
2. 細み替えヒト血清トランスフェリン。
3. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属結合ドメインを含む、トランスフェリンの細み替え半分子。
4. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン半分子。
5. 3個の突出部がヒト前清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲3に記載のトランスフェリン半分子。
6. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属結合ドメインを含む、天然変異体の金属に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、天然変異体トランスフェリン半分子。
7. 鋼に対する結合力が天然のトランスフェリンより強い、請求の範囲6に記載の天然変異体トランスフェリン半分子。
8. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属結合ドメインを含む、天然のトランスフェリンの位置206のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲7に記載の天然変異体トランスフェリン半分子。
9. トランスフェリン、又は少なくともトランスフェリンの1個の突出部の結合ドメインを含むトランスフェリン半分子をコードする核酸、真核細胞中の発現に適した連続的調節要素と組合させて含む核酸複合物を含む、真核発現ベクター。
10. 核酸複合物がトランスフェリン又はトランスフェリン半分子をコードする核酸に結合したトランスフェリンシグナル配列をコードする

核酸を含む、請求の範囲1に記載の真核発現ベクター。

11. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのアミノ末端突出部である、請求の範囲1に記載の真核発現ベクター。
12. 1個の突出部がヒト血清トランスフェリンのカルボキシ末端突出部である、請求の範囲1に記載の真核発現ベクター。
13. トランスフェリン半分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲1に記載の真核発現ベクター。
14. 請求の範囲1に記載のベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞系。
15. 請求の範囲1に記載のベクターを用いてトランスフェクションされたベビーハムスター腎細胞系。
16. 少なくともトランスフェリンの1個の突出部の金属結合ドメインを含むトランスフェリンの細み替え半分子を、金属の選択性を下げるのに十分な量で患者に投与することを含む、金属キレート化治療の方法。
17. 金銀が該である、請求の範囲1に記載の方法。
18. トランスフェリン半分子が天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する実験薬である、請求の範囲17に記載の方法。
19. トランスフェリン半分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置206にグルタミン残基を含む、請求の範囲18に記載の方法。
20. 細み替えトランスフェリンを含む相容培養細胞のための非血清培養液。

## 明　　細　　章

細み替えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、及びそれらの天然変異体

## 発明の背景

集合的にトランスフェリン又はシテロティリンと呼ばれる鉄-結合ブロドウグロブリンは、著しく悪性の疾患を有するタンパク質の種類を含む。ヒトアクトフェリン (Anderson, B. F. et al.,

(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1769-1773) 及びウサギ血清トランスフェリン (Ball Ley, S. et al., (1988) *Biochem. J.* 271: 58-64 = 5812) のX-線結晶学的分析は、これらのタンパク質が短い繊維ペプチドにより連結された2つの類似した突出部を含み、各突出部は金属イオン及びカルボニルイオンのための結合部位を含む長い繊維蛋白質を形成する2個のドメインを含むことを明らかにしている。

ニワトリオボトランスフェリン遺伝子が形質転換マウス中で発見され (McKnight, G. S. et al., (1983) *Cell* (Cambridge, MA) 34: 335-341)、キャットトランスフェリンの一部とガラクトシダーゼの融合タンパク質が *E. coli* 中で発現された (Alford, A. et al., (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 960-965)。この融合タンパク質を除き、同様にしてトランスフェリン又は分子の一部を見出せるが成功であった (Alford, A. et al.,

(1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

122: 960-965)。おそらくタンパク質の濃度は回収状の構造及び分子内の多數のジスルフィド架橋がバクテリア宿主中の毒性に対する主要な障壁であろう。アルカリホスファターゼシグナル配列を利用してタンパク質をバクテリア膜脂質に向かわせることにより、天然のタンパク質の折りたたみ構造を部分的に最小にする試みは不成功であった。

## 発明の概要

本発明は細み替えトランスフェリン、少なくともトランスフェリンの1個の突出部 (アミノ末端又はカルボキシ末端) の結合ドメインを含む細み替えトランスフェリン半分子、及びトランスフェリンの発現のための安定な組合せを表す。細み替えトランスフェリンは完全な赤色細胞、例えばベビーハムスター腎細胞や癌細胞で発現して全-スルボ半分子の形態の基本的に均一な (半分散) 調料を与えることができる。本発明は又、天然 (野性一型) の形態のトランスフェリンと異なる金属-結合枝又は他の性質を有する天然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン半分子に関する。これらには既又は他の金属への結合が天然のトランスフェリンより強いかあるいは弱いかである天然変異体トランスフェリン及びトランスフェリン半分子が含まれる。

トランスフェリン半分子は金属調節異常症又は金属中毒にかかる患者の処置のための金属キレート化治療に使用することができます。例えばトランスフェリン半分子、特に天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体をサラセニアなどの軽-過剰負荷患者に投与し、その体から過剰の毒性の鉄を除去することができる。さらに半分子又

### 特許平7-502723 (3)

は金属イオン選択性が変わられたその突然変異体を用いて他の毒性金属、銅、鉛、水銀、カドミウム、錫又は亜鉛を体から除去することができる。

#### 図の説明

図1はpN2TににおけるpN2NUT表現ベクターの構造を示す。ヒト血清トランスフェリンをコードする。3'側のcDNAをヒト原種と日本A型イブリカリから単離し、完全アミノ酸配列をもつ。5'側のPst I-L-Hind IIIラグメントをM1.3mbL S中にクローニングする。二重終止コドン及びHind III認識配列を特定位に突然変異導入により導入し、Bam HI-Hind IIIラグメントの構造を可能にし、それがBam HI-Hind IIIラグメントと結合する右アミノ酸配列アミノ酸配列をコードした。このラグメントを直接表現ベクターpNUT中にクローニングし、ベクターpNUT-pTF/N2を得た。このプラスミドにおいてトランスフェリンcDNAはメクロチオルインプロモーター(MMT-1プロモ)及びヒト成長ホルモン新規性シグナル(hGHSS)の制御下にあり、pNUTはヒト白斑症ウィルスからの転写抑制シグナルを用いて蛋白質cDNA(cDNA-DHF-R-cDNA)の発現を促進するSV40初期プロモーター(SV40I)をもむ。

図2は、種々のペビーハムスター腎臓細胞系からの免疫沈降物のウェスタンブロットを示す。2H2-肺臓細胞癌細胞からの細胞ライソーム(\*)及び核(\*)の試料を硝酸アツF抗血清を用いて沈降させた。対照画したペレットの試料をNaDODS-SO<sub>4</sub>-PAGEにより分離し、ストロセルマースに移し、並べて手すき面糊及びその後アルカリホスファ

図3は組み替えたTF/2Nの標準気共鳴スペクトルを示す。(a) 2H2のラインプロードニングを用いたフーリエ変換スペクトル。(b) 4M<sup>2</sup>のラインプロードニング及びC=4.0, NS=6.88.0に与ける回転差スペクトル(Convoluted difference spectrum)。タンパク質試料はH<sub>2</sub>O中の0, 1M KCl, 0, 1mMで溶かしてある。

図4はD-TF-Ty<sup>+</sup>組み替えたTF/2Nの標準気共鳴スペクトルを示す。図は10回のラインプロードニング、NS=3, 0.00を用いたフーリエ変換を示す。タンパク質試料はH<sub>2</sub>O中の0, 1M KCl, 0, 1mL中で6mLであり、(各回はH<sub>2</sub>O中の0, 1Mの三ツイ化鉄)であった。

図1はTF/2Cコード配列の創成のためにPCRプライマーとして用いた2つの別々のオリゴヌクレオチドを示す。金カルボキシ酸由来のためのコード配列を含むEco RI剪断ラグメントを、25回のPCR増幅の熱型として用いた。オリゴヌクレオチド1はGma「銀歯斑」、及び天然のTFシグナル配列をその5'末端に含む、その3'末端でTFのアミノ酸834-841のコード配列を含む。オリゴヌクレオチド2はTF-cDNAの3'末端翻訳領域の配列を含む。5'の部位に第2のGma「銀歯斑」を組合せた。

#### 発明の詳細な説明

本発明は組み替えたトランスフェリン、組み替えたトランスフェリン单一分子、及び天然のトランスフェリン分子と比較して金属-結合能の向上など、後者に変化した金-銀トランスフェリン及びトランスフェリン单一分子の突然変異体を与える。組み替えたトランスフェリンは大量に、及

ターザ複合抗体とGを用いて製造された。pGHI-pNUT及びpNTF/N2-pNUT細胞系を500gMのMTX中で選択し、DMEM/10%ケンタッキーベーク牛血清中ですべての細胞を培養した。1列、BHK細胞；2列、pGHI-pNUTトランスフェクションBHK細胞；3列、pTF/N2-pNUTトランスフェクションBHK細胞。分子量マーカー(x10<sup>3</sup>)の位置をプロットの右に示し、追加のM, 3.7, 9.00のタンパク質バンドの位置もプロットの右に示す(<37)。

図2はTF/2Nの用意及びPPLC分離を示す。(バカルム)組み替えたTF/2N(上段)及びタンパク質分解酵素TF/2N(下段)のPolyanion-SFのカラム上におけるPPLC結果。

(バカルム)分子量標準(Mr例)及びバカルムからのピークa~dの各SugのNaDODS-SO<sub>4</sub>-PAGE(アクリルアミドの5-12%勾配)。(バカルム)PPLCピークa~d(組み替えたTF/2N)及びバカルムからのピークe~h(タンパク質分解酵素TF/2N)の並置溶液条件下におけるウエアードPAGE。アボランバク質(Epo)及び核-結合タンパク質(Fn)の位置を示す。示された用いられた条件は材料及び方法にて示す。PPLC部分は以下のよう記載: ピークa(留分2.3-2.7)、ピークb(2.8-3.1)、ピークc(3.2-3.8)、ピークd(3.9-4.5)、ピークe(2.8-3.1)、ピークf(3.2-3.6)、ピークg(3.8-4.4)及びピークh(4.6-5.1)。

図4は1.0mMのFe(III)-(NTA)<sub>4</sub>を用いた主要形態の組み替えたTF/2Nの測定を示す。タンパク質の量は上、0.0mlの上、0.0mM NaHCO<sub>3</sub>中の3, 6.8A<sub>260</sub>吸光度であった。電気泳動装置に既にそれぞれ加えた後5~10分間可視スペクトルを測定した。

び実質的に等量の(単分散)形態で製造することができる。組み替えた血清トランスフェリンの組み替えた分子は、他のヒト血清タンパク質を實質的に含まない基本的に等量の最終として製造することができる。対照的にクロータンパク質のタンパク質分解により製造された單一分子は複数が困難で、実際にヒトトランスフェリンのカルボキシ末端半分をタンパク質分離の手段により完全に製造することはできない。組み替えた法は、トランスフェリンの新規形態の設計及び製造に突然変異導入を適用することも可能にする。

一般に本発明の組み替えたトランスフェリンは、トランスフェリンをコードする複数種類を用いて再した宿主細胞をトランスフェクションし、トランスフェクション宿主細胞を必要に適した条件下で増殖し、樹突により表現された組み替えたトランスフェリンを回収することにより製造される。各種のトランスフェリンのアミノ酸配列が報告された(J. J. Lescar, J.-M. and Chambon, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122: 291-295; MacGillivray, R. T. A. *et al.*, (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 3543-3553; Metz-Boutigue, M.-M. *et al.*, (1984) *Eur. J. Biochem.* 145: 659-676; Rose, T. M. *et al.*, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1261-1265; Baldwin, G. S. and Weinglock, J. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 8720-8730)。ヒト血清トランスフェリンのDNA配列が決定された(Yang, P. *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. S*

c. U.S.A. 82 : 2752 - 2756)。組み替えたトランスフェリソの製造のための全一長DNA又はトランスフェリンあるいはその一部のアミノ末端又はカルボキシ末端突出部のいずれかをコードする切断DNAを、利用できる供給源から得ることができるか、又は標的の方針により既知の順序に従って合成することができる。組み替えたトランスフェリンを細胞培養中に分泌させるために、トランスフェリンシグナル配列(又は発現系に適した他のシグナル配列)をコードするDNAをトランスフェリンシグナルコードDNAの上部に置く。

トランスフェリン及びトリンスフェリン半分子の突然変異酵母、特に医療の突然変異説明の標準的方法により製造することができる。Taylor et al. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13 : 8749 - 8764; Zolot et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 100 : 458 - 500を参照。特に突然変異説明を用いて天然のトランスフェリンと異なる全區結合位を有する突然変異トランスフェリンを製造することができる。例えば、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合することができる突然変異体を製造することができる。そのような突然変異体の選択のためにには、女房一結合ドメインの突然変異を発見し、結合に含まれる上層又はそれ以上のアミノ酸を別のアミノ酸と置換する。ヒト血清トランスフェリンの場合の全員キレート化のためのリガンドであるアミノ酸を下記に示す(アミノ酸の構成の数は一次配列中のアミノ酸位置の位置を示し、その場合成熟タンパク質の第1位置を位置1と省略する)。

アミノ末端側山野

カルボキシ末端突出部

他の酵素をコードする。これにより、トランスクレッショングされた細胞を非常に高濃度(0.5 mM)のメトトキセカート中で直接選択することが可能になり、ジヒドロキレートレダクターゼの不足した受容性細胞株の必要性を廃する。pM114はpUC18導入形列を含み、それによりドリフリド<sub>1</sub>がE. coli L-1中で増殖されて受容性細胞のトランスクレッショングのために十分な量のプラスミドを与えることができる。

トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターは、遺伝子宿主細胞中に導入される。好ましい宿主細胞は、ベクターを用いて形質転換され、標的的に活性のトランスフェリン構築物を発現する安定な細胞系を与えることができる実験細胞である。特に有用な細胞はベビーハムスター腎臓細胞である。ベビーハムスター腎臓細胞は、トランスフェリンをコードするDNA構築物を含むベクター(例えばpM114など)を用いてトランスクレッショングされ、標的的に活性なトランスフェリン(全又は半-分子)を発現し、分泌する安定な細胞培養系を与えることができる。これらの細胞は経済的な大規模生産に十分適しており、容易に利用できる供給源から得ることができる。

リン酸カルシウム共生又はエレクトロポレーションなどの標準的方法を用い、真核細胞をベクターでトランスクレッショングすることができる。その後細胞を、トランスフェリンの発現を検査するために適した条件で培養する。例えばpM114ベクターを用いてトランスクレッショングしたベビーハムスター腎臓細胞を、乾燥剤の存在下で凍結し、トランスフェリン構築物を充填させることができる。ベビーハムスター腎臓細胞は、脂質透析U1 (透析膜: 0.22 (G1600)) を終えて含むDulbeccoの改良Eagle液培地一日前から、F-12栄養剤

(アミノ酸1 - 327)	(アミノ酸343 - 679)		
アスパラギン酸	68	アスパラギン酸	992
チロシン	93	チロシン	426
チロシン	188	チロシン	519
ヒステジン	249	ヒステジン	584

他の種類のトランスフェリンの場合、番号が異なりリガンド(アミノ酸)は同一である。

トランスフェリンの貼の領域は結合を制御し、これらも突然変異酵母の標的となることができる。通常これらは常に帶電したアミノ酸、例えばリシン、ヒステジン又はアルギニンである。例えば天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン半-分子は、206位のリシン基をカルクミンで置換することにより(AAG→CAG) 製造することができる。

トランスフェリンコードDNAを、DNAの発現を指示するための導いた調節要素を含む真核発現ベクター中にクローニングすることができます。好ましい真核発現ベクターはpMT114 (R. D. Smith, (1987) *Cancer* 50 : 435 - 442)により記載されたプラスミドpMT114である。このプラスミドはノックオナインプロモーターを含み、それは重金属及びヒト成長ホルモンの結合停止シグナルの存在下におけるトランスフェリンコードDNAの転写物を含む。さらにpMT114は、相続性細胞中ににおける選択を可能にするためのヒトB型肝炎ウイルスからの転写停止シグナルと共にS40初期プロモーターの制御下にあるダヒドロキレートレダクターゼ遺伝子を含む。遺伝子は、競争的阻害剤メトトレキサートに対する親和力が2.70倍低い突然変異

化合物の培地中で増殖するのが好ましい。

遺伝子培養期間の後、発現され、分泌されたトランスフェリンを培地中で回収することができる。標準的精製法を用いて組み替えたトランスフェリンの実験的等電点試験を得ることができる。1つの具体化の場合、培地中のトランスフェリンに鉄を抱合させ、その後アニオン沈殿クロマトグラフィーにより精製する。

本発明の組み替えたトランスフェリンは、既又は他の陽性金属とキレート化し、体から除去するのに用いることができる。生物内の鉄オレート化の過程の初期は、微生物細胞の天然に存在する多様なシクロフォア及び合成鉄キレート剤を、その生物学的效果、主に鉄と結合して体から除去する能力により評価することであった。このような化合物の多くが研究され、鉄の除去の能力は様々であり、多くの場合計算し得ない副作用があった (Pittel, C. G. et al. (1978) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 208 : 12 - 18)。その結果、ヒトから過剰の鉄を除去するため用いられるキレート剤として、ストレブトミセス・ゼロックス (Streptomyces zelotrichia pilosilis) からの菌糸ペプチドであるデフロキサインのみが残っている。

鉄キレート代謝薬に好ましいトランスフェリンは、天然のトランスフェリンより強く鉄と結合する突然変異体トランスフェリン半-分子である。突然変異体半-分子の最初に上り、金属のより有効なキレート化及び除去が可能になる。特に好ましい突然変異体半-分子は、下記の実施例に記載するK206Gであり、これは206位のリシンではなくカルタミンを含む。トランスフェリン半-分子は、ホローランバク質を異なった蛋白質の結合体を形成し、膜中に封泡され、從って金属がキレート化さ

## 特表平7-502723 (5)

れるのみでなく体から除去されるので有効である。さらに脂肪の車一部分は脂酰細胞の膜上のトランスフェリンレセプターと結合しないので、これらの細胞に結合しない。さらにヒトトランスフェリンの車一部分はおそらくヒトの体により「自己」と認識され、從って免疫学的応答を引き起さない。

またに突然変異体車一部分子は、金属性イオン選択性が異なるように設計することができる。セレート化剤を用いて他の毒性金属、例えば鉛、水銀、カドミウム、銅及び亜鉛を体から除することができる。

セレート化治療の場合、金属をセレート化して崩壊産毒を毒性濃度以下に下げるのに十分な量で組み替えたトランスフェリンを患者に投与する。一般にこれは生理学的に許容し得るビヒタル、例えば食塩水中で、希朧回的経路で(典型的に筋筋肉)投与する。

組み替えた車一部分子は、細胞培養培殖のための非細胞液細胞液中で使用することができる。トランスフェリンは成長細胞による転換吸収が必要である。組み替えたトランスフェリンの使用により、ヒト細胞から精製したトランスフェリンに伴う汚物質(例えばHg, V又は鉛、銅、ウラン)の危険を避けることができる。

本発明を以下の実施例によりさらに明示する。

### 実施例

#### 1. アミノ末端突出部を含む組み替えたトランスフェリン車一部分子の合成

##### 材料

T4-DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI(タクシラブリゲン)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼは、Pharmacia-PL

Biochemicalsから購入した。GリニンドスクレアーゼはPharmacia PL Biochemicals及びBethesda Research Laboratoriesから購入した。オリゴデオキシリボヌクレアーゼは、Applied Biosystems-380A cDNA合成機上で合成した。エトロキルロースフィルターは、Schleicher and Schuellから、<sup>32</sup>P-標識アルカリ性ヌクレオツチドはNew England Nuclearから、セツク抗体トトランスフェリン抗血清はSigma Chemical Companyから、ホルマリーン固定スクフィロロックスアルカウス(*Sarcophylococcus aureus*)細胞は、Bethesda Research Laboratoriesから、プロトプロテクト(Protektol)免疫スクリーニング液状系はPromegaから、オリゴヌクレオチドマークター(oligonucleotide marker-directed)突然変異型抗体はAmericanから、Dulbeccoの液体必須培地及びウシ胎児血清はDifcoから、及び第一セトトランスフェリンモノクローナル抗体はMFP-14はCzechoslovakian Academy of Scienceから得た。此の試験はすべて分析用が又はそれ以上の純度であった。

##### 方法

ヒト胎盤トランスフェリン(hTTF)-cDNAの合成 Dr. Steven Orkin (Harvard University) 調査による *E. coli* 上野型ベクター pKT-218 (Prochownik EK, E. V. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 2

58: 8389-8394) 中に報告されたヒト胚盤cDNAライプラリを、血清ヒトTTFのアミノ末端8アミノ酸をコードする合成オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成プローブとして用いてスクリーニングした。オリゴヌクレオチドはYang, F. et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 2752-2756により報告されたヒトTTF-cDNA配列のヌクレオチド88-111位に対応した。オリゴヌクレオチドは4種オリゴヌクレオチドキナーゼ及びATP-CTPを用いて末端-保護し (Chaconas, G. and van de Sande, J. H. (1980) *Methods Enzymol.* 65: 78-85)、約10<sup>5</sup>個のコロニーのスクリーニングに用いた。陽性のクローニングの制限エンドヌクレアーゼマッピング及び組換え配列分析を、それぞれpUC19及びM13mp19ベクターを用いて標準的方法で行った (Maniatis, T. et al. (1982) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Messing, J. (1983) *Methods Enzymol.* 101: 20-78; Sanger, F. et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 5463-5467)。

疊型ベクター及び細胞培養 畠井義典ベクター-pNUT (Palmier, R. D. et al. (1987) *Cell* (Cambridge, MA) 50: 435-443) 及びベビーハムスター腎臓(BHK)細胞はDr. Richard D. Palmier (Brown

ed Hughes Medical Institute, University of Washington) の提供による。合成後、オリゴヌクレオチドをC<sub>18</sub>逆相カラム上で精製した (Sep-Pak Waters Associates; Atkinson, T. and Smith, M. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (Gait, M. J., Ed.) pp 86-81, IRL Press, Oxford)。Taylor, J. W. et al. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13: 8749-8754の方法を用いることにより、特定位組の突然変異誘発を行った。プラスミドDNAは、*E. coli* JM109から調製し、塩化セシウム密度勾配を用いた2重構造形成により生成した。

BHK細胞を、10%のウシ胎児血清を含むDulbeccoの液体必須培地(DMEM)中で10-cmの皿当たり約10<sup>5</sup>細胞で成長させ、ついでSeznice, P. F. et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 1480-1489に記載のリン酸カルシウム沈降法により10ルートのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、培地を100μlのメトトレキセート(MTX)を含むDMEMに戻し、生存細胞を5,000μMまで濃度に濃縮した。いくつかの実験では300μMのMTXを直接用いて細胞を選択した。大細胞の回転培養は、10.0mlのDMEM-MTXを含むそれぞれ8.00cm<sup>2</sup>の回転器中に約5×10<sup>5</sup>細胞を播種して開始した。ZnSO<sub>4</sub>を0.08mMの濃度まで培地に加えることにより80%の導密度にて培養物を調整した。培地を4時間後に収集した。

## 特表平7-502723 (6)

免疫-沈降及びウェスタンブロッティング 褐細胞培養地及び細胞ライカートの免疫-抗体を、Van Oest, B. A. et al. (1986) *Biochem. Cell Biol.*, 64: 690-700の方法により行った。沈降物をNaDODS-O<sub>4</sub>の存在下における12%ボリアクリルアミドゲル上の電気泳動により分析し (Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)*, 227: 660-665)、その後ニトロセルロース膜上にプロッティングした。プロットを0.1mg/mlのゼラチンを含むPBS中にセインキュベートし、その後ヒツジ血清アントシアニン (PBS中で260-倍希釈) を用いて処理し、最後にアルカリホスファターゼ-度合カサギ抗体 (IgG抗体を用い、供給者の指示に従って発色した。

アミノ酸配列 3-アラニロオキサロリンを組み替えたTF/NM中にはTF-NMRプローブとして挿入するため、培養初期に培地中に1%のレチコロン濃度でD,L-アラニロオキサロリン (Sigma Chemical Company) を組み替えた。細胞はD,L-アラニルオキサロリンのない培地と同様にこの培地上でも十分に成長した。

組み替えたTF/NMの単離 収穫した培養細胞をフェニルメチルスルホニルフルオリド中で、0.1%としてプロテアーゼを阻害し、培地中のトランスクレッターリンのすべてを抑制させるのに十分なTris (1M) (NTA)<sub>2</sub>を加えた。液温で搅拌した後、溶液を冷涷液滅菌に対して24時間。その後 SDS-PAGE-電気泳動に対して装置を洗浄した。液体リオーナーHCl液 (pH 8.4を5mMの酢酸溶液まで加え、結果を確認して破壊を防ぐ)、10mMのトリス-HCl液 (pH 8.4を平衡化しないDAE-Sephadex (Pharmacia) のカラム (8.73) に従ってウレア-PAGEを行った。3.0mlのガラスカラム (LKB) 中の0-5.0%スコース勾配柱で0-3%のPharmalyte、pH 5-8 (Pharmacia) を用いて蛋白質電気泳動を行った。カラムは1.000Vにて2mAの最終電流にて複数溶出槽中を走行した。

0.2ml中の試料を勾配の半ばから回収したら漏斗の溶液を希釈した。その後試料をカラムの最高濃度側に再注入し、当中を24時間洗浄した。洗浄をカラムの底から1.5mlの部分で行った。各部分をAcetone及びH<sub>2</sub>Oに通じて分析した。最高Abs<sub>280</sub>を有する部分を、アボート及び統一純度タンパク質のものとするとして選択した。

次は、1mMのNTA、1mMのビリトム、0.1Mの酢酸ソルトリウムを含む調査液、pH 8.4、当中でインキュベートすることにより、ホーリータンパク質から容易に除去できた。アボートタンパク質をCentriprep-10 (Amicon) 上で最小体積で透析し、その後水を用いて2回、及び0.1NのKClを用いて2回透析して再溶解した。アボートタンパク質は純水中で沈澱する傾向があるが、0.1MのKCl中に容易に溶解解した。アボートタンパク質をNaHCO<sub>3</sub>中で1.0mMにし、4.65ml中で吸収を監視しながら適した濃度のTF (NTA)<sub>2</sub>で調製した。

組み替えたTF/NMの定量的差異検定 動物的細胞免疫検定を用い、精製の種々の段階で培養液中の組み替えたTF/NMの濃度を評価した (Foster, W. D. et al. (1982) *Thromb. Res.*, 28: 649-661)。タンパク質分離-調査TF-NTA-2N (Lineback-Zins, J. and Brew, K. (

ラム (2.5×8.0cm) に負荷した。

その後カラムを透析液中のNaClの濃度勾配 (0~0.3M) を用いて洗浄した。ピンク色を示す部分をNaDODS-O<sub>4</sub>-PAGEにより分離し、組み替えたタンパク質 (Mr 37,000) を含む部分を集めた。そのような部分は、細胞培養培地中のウシ胎児脛済からのウシトランスクレッターリン及びアルブミンも含む。集めた部分をAmicon P-M-10膜上で5mlを濃縮した後、タンパク質を、1.00mMの醋酸水素アモニウムで平衡化したSephadex G-75 Superfine (Pharmacia-P-L Biochemicals) のカラム (2.5×8.0cm) 上のクロマトグラフィーにかけた。

ウシトランスクレッターリンを完全に分離するため、このカラムを通じる毎回のクロマトグラフィー段階が必要な場合がある。この段階でMr 37,000附近に、0であり、汚染ヘムオースタンパク質 (おそらくヘモキシン) の存在を示している。TF-NTA-2Nは、5.0mMのトリス-HCl、pH 8.0中のNaClの濃度勾配 (0~0.3M) を用いたP-10 fractionation-SI (Pharmacia) のカラム (1×1.0cm) 上で1ml/分の流量にて1時間かけたTF-NTA-2Nにより最終的に精製して終焉した。上のもの部分を集めた。タンパク質の終末濃度を計算して2-4倍のクレッターリンバンドがカラムから見れた。

5%~12%勾配ゲルを用いてNaDODS-O<sub>4</sub>-PAGEを行い、Mealey, D. G. and Seal, U. S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 452: 250-256の方法の修正版 (Brown-Mason, A. and Woodward, R. C. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259: 1866-1

8.0) *J. Biol. Chem.*, 255: 708-713) を用いて抗ヘムオースタンパク質 (Pierce Chemical Company) を用いて抗原ヨク素化し (Fraker, P. J. and Speck, J. C., Jr. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80: 848-852)、標識をして用いた。モノクローナル抗体であるTF-14をプローブとして用いた (Bartelak, J. et al. (1984) *Folia Biol. (Praha)*, 30: 137-140)。この抗体はTFのアミノ末端実験部のみを認識し (Mason, A. B. et al. (1982) *Biol. J. Haematol.*, 38: 382-393) ウシトランスクレッターリンを認識しない (Penhall Low, R. C. et al. (1988) *J. Cell. Physiol.*, 128: 251-260)。

アミノ末端配列分析 組み替えたTF/NMの外生表面膜及び生表面膜両方のアミノ末端配列をUniversity of VermontのGlycine Analytical Facility及びApplied Biosystems 470A Protein Sequencer上で決定した。

過ヨード酸-クレッターリン染色 組み替えたTF/NM中のカリブ糖の存在を、タンパク質を過ヨード酸-クレッターリンで処理することにより決定した (Fairbanks, G. G. et al. (1971) *Biochemistry*, 10: 2605-2617)。

核磁共振スペクトル Camille and Henry Dreyfus NMR Laboratory, Department of Chemistry, University of Vermont

## 特許平7-502723 (7)

日本におけるも、872 Tecnia Broker WM NMRスペクトロメーターにて、次報機出 (quadrature detection) を用いたカーリエスコープモードで操作してプロトン及びフェニルNMRスペクトルを得た。<sup>13</sup>Fプローブはその専門のD.F., Chaitin & Strophe, W. A. により提供された。プロトンスペクトルの場合、スペクトロメーターの設定は前記の通りであった (Vale et al., A. A. and Woodward, R. C. (1987) *Biochemistry*, 26: 3120-3125)。<sup>13</sup>Fスペクトルの場合、繰り返し30 G, 0.00 Hzであり、アケイクション時間は0.22ラ秒であり、アケイクションを1.6, 0.1 s (9.0°) のパルスの間に2.0秒のレシーバーディレイ (receiver delay) が介在し、試料は30.8°Cであった。<sup>13</sup>F化粧シフトは<sup>1</sup>H-NMR中の約1Mの三フッ化酢酸に対する。テンパク質濃度は0.1mL中の約8原子%<sup>13</sup>C, 0.1%<sup>15</sup>Nである。スペクトルは<sup>1</sup>H-NMRを含む堆積的5mm NMR管に挿入された。1mLのカプセル中のこれらの試料はつき充填した。<sup>13</sup>Fスペクトルの自由誘導衰減 (Free induction decay) につき、アーリエ変換の前に30.0 msのランプモードニングを行った。

### 結果

ヒトTF-cDNAの単離、ハイブリッド形成プローブとしてヒトTF-cDNAの5'配列への24塩基オリゴヌクレオチドを用いてTFとcDNAライプラリ (Prochownik, E. V. et al. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258: 8389-8394) の約100,000個のコロニーをスクリーニングした。上図の間

性のコロニーを得た。このコロニーから単離されたプラスミドの塗抹網 (extensions) 制限酵素マッピングは、Yang, F. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2752-2756により同一のライプラリから単離されたヒトTF-cDNAから予想されたパターンと完全に一致した。このクローニングの一枚びり<sup>1</sup>末端のDNA配列分析は、それがアミノ酸 (aa) により単離された全長クローンと同一であることを確認した。このcDNAの突然変異発見及びナブクローニングの間に行われるその後の配列分析はすべて以前に報告された配列に正確に合った。

ベクター構成及び確認。2倍の慶祝停止コドン及び3倍のHind IIIの認識部位を含むTF-cDNA配列のアミノ及びカルボキシ末端オクタインの側のリンクー構造に、オリゴヌクレオチド-指示突然変異発見により導入した。この構造物からの指定翻訳配列は、曲線TF-蛋白質配列に従いAAGG→337で終わる (MacGillivray, R. T. A. et al. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 3543-3553)。

表現ベクターpNUT (Palmitier, R. D. et al. (1987) *Cell*, 50: 435-448) はマウスマタチオネオシン-1ノート成長ホルモン連鎖蛋白を含み、これは形質転換マウスにおいて多量のヒト成長ホルモンを発現することが示された (Palmitier, R. D. et al. (1983) *Science* (Washington, D. C.), 222: 809-814)。このベクターの重要な機能的特徴には、マウスマタチオネオシン-1プロモーターに重金属の存在下でcDNA転写を誘導させ、E-

cDNA中で約10%の複製及び選択を可能にし、S440初期プロモーターにより説明されたジドロ尿酸レダクターゼ (DHFR) cDNAの細胞培養物における選択を可能にすることが含まれる。DHFR-cDNAは、競争的阻害剤メトトレキセート (MM) に対する親和力612.0-倍強の突然変異体をコードする (Simoneau, S. C. C. and Levinson, A. D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2495-2499)。これは、トランスフェクションを行なった細胞を非常に高濃度 (0.5 mM) のMM又は中等濃度のMMを添加することを可能にし、DHFRの不足した感受性細胞系の必要性を示す。

表現ベクターpNUT-TF-cDNA/2Nの創立のために、バクテリア表現ベクターからBamHI-HindIII「フラグメント」を用意した (図1)。最初のトランスクレベリン-cDNAクローンからのHindIII-BamHI「フラグメント」も準備した (図1)。その後これらとの2つのフラグメントを、Xba I及びHindIII-EcoRIを用いて切断したM13 phageの複製可能形態質粒中に導入して複製した。得られた株よりフラグメント中の複製停止シグナルを削除し、Xba I及びHindIII-EcoRIを用いて切断することにより插入片を抽出せず、末端を平滑末端とした。これらの段階は、フラグメントが複製停止シグナルを含み、テンパク質のための天然のシグナル配列を保持し、最初のベクター中にあるS440-C末端を含まないことを確認する (図1)。このフラグメントをSma Iで切断しNUT中に挿入し、かくしてヒト成長ホルモン連鎖子はTF/2NコードcDNAと置換されるが成長ホルモン連鎖子からの複製停止シグナルはそのまま残った。このゲノムドミノを最初細胞中にトラン

スフェクションし、得られた形質転換細胞をH4存在下で選択した。

トランスクレベリンされたB君長細胞により製造された同cDNA導入物の分析のために、カルムアルデヒドの存在下のアガロースゲル上で全RNAを電気泳動させた (Maniatis, T. et al. (1982) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。ニトロセルロース上に移した後、ハイブリッド形成プローブとしてbGH遺伝子の5'端翻訳領域に対するオリゴヌクレオチドを用いてプロットを分析した。トランスクレベリンされた細胞系で約1.4Kbの標準cRNAが抽出されたが、純粋ヒトcDNA細胞では抽出されなかった (データは示していない)。これよりTF/2N-2NcDNAの推定サイズと一致した。

形質転換されたB君長細胞により製造されたオリゴヌクレオチドの分析のために、種々の細胞系の細胞サイマー及び培地の両方につきウエスターインプロット分析を行なった (図2)。且つ長細胞、bGH-cRNA/TF/2N-cDNAを含むB君長細胞及びTF/2N-pNUTプラスミドを含むB君長細胞の試料をDMEM (B君長細胞) 又はDMEM-MTX (pNUTベクターを含むB君長細胞) 中で培養した。細胞が集落に達したら培地の試料を採取し、細胞ライセートを調製した。これらの試料を適切な抗HITF-抗体 (IgG及びIgM) 固定-S-アウレウス (S. cerevisiae) 細胞と共にインキュベートした (Van Oosterom, B. A. et al. (1986) *Biochem. Cell. Biol.*, 64: 699-706)。

## 特表平7-502723 (8)

$\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{O}_4$ と共にインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させ、エトロセルロース膜に移すことにより結合タンパク質を検出した。その結果をヒツジ抗ヒトTF抗体測定法がアルカリホスファターゼと複合化したウサギ抗ヒツジ免疫グロブリンと共にインキュベートした。ヒト細胞からの細胞ライセート又は培地(図2、13列及び14列)、あるいはヒトH-R-NUTプラスミドを含むヒト細胞からの細胞ライセート又は培地(図2、20列及びヒト)を分析すると、最初のヒツジ抗ヒトTF抗体から干渉されるヒツジ免疫グロブリンバンド(Mr = 25,000及び50,000)及び少數の交叉免疫複合物質のみが観察された。しかしTF/2N-pNUTプラスミドを含むヒト細胞の細胞ライセート(図2、3a列)又は培地(図2、3b列)中に、さらにMr = 37,000のバンドが観察された。この表示ペーパー下膜の分子量14、アミノ酸配列から算出されたTF/2N分子の分子量(37,833)と非常に一致している。

TF/2N生成物の等電性は、SDS-PAGE上で初期のライセート及び分泌試料が大変動した際のシグナル配列の除去の成功を示す。次に膜中にウシ抗ヒトTFを用いた場合とヒト抗ヒトTFに活性性が高いことがわかる。

回転柱で洗滌されるTF/2N細胞系の実験操作の場合、培地中のHTF/2Nの濃度はラジオイムノアッセイにより洗出しして約1.0-1.5 µg/mlであった。

組み替えたTF/2Nの洗滌及び報告　組み替えたTF/2Nを3段階液により精製し、それはラジオイムノアッセイに基づいて80%の収率の主要形態のタンパク質を目的的に与える。Polyacrylamide

TF/2Nの最終的精製は、ウレア-PAGE(図3、パネルC)により確認される通り、タンパク質の非主要成分(< 6%)及び主要成分(図3、パネルA)の双方のアボー及びホーリー形態を定量的に分析した。ウレア-PAGE上でも最も移動の遅いバンドはアボートTFや2Nであり、移動の速いバンドはHTF/2Nであることに注意してほしい。 SDS-PAGEゲル(図3、パネルB)は、去勢形態及び非主要形態の組み替えたTF/2Nが、等分子量の部分性であり、主要成分がTF/2Nより脱水化合物を含まない(データは示していない)ことを示した。

一般にこれらの結果は、原産の抗ヒトTF/2Nより得られた準分離能を有するようである(Lineback-Zink, J., and Brew, K., (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 703-713) (図3)。例えばクロマトグラフィーのピークは前者の場合の方がより規則的であり、クレア-PAGE上のバンドの数は後者の方が多い。ホーリー和組み替えたタンパク質の場合のスペクトル比は、典型的に $A_{280}/A_{260} = 2.1$ 及び $A_{280}/A_{410} = 1.38$ であり、これはヒト血清から単離された純粋なトランスフェリン二糖の場合に得るとも近似ない。Teek(NTA)<sub>2</sub>を用いたアボートタンパク質の3,685 kDa単位の測定は、 $E_{280}$ (M=3,1)に相当する吸光度を示す。アボートタンパク質のモル吸光度 $M = 3.8$ を示し(図4)、両方共、ホートラニスフェリン分子として合理的な値である(Lineback-Zink, J., and Brew, K., (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 703-713; Zek, G. et al. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 742: 490-495)。アボー及びPFE-h

TF/2Nの場合のMrはそれぞれ3,5及び3,4であった。

非主要及び主要形態の両方の組み替えたTF/2Nのアミノ酸塩配列分析は、血清からのアボートTFの場合に見いただされた結果と同一の結果を得た(Maccallum, R. T. A. et al. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258: 8548-8553) (表2)。

組み替えたタンパク質のプロトノMRスペクトル(図5)は、タンパク質分解-精製TF/2Nのスペクトルと非常に似ている(Valet, A. A. and Woodworth, R. C., (1987) *Biochemistry*, 26: 3120-3125)が、組み替えたタンパク質の収率の方が非常絶対的。m-T-チオテンを抽出した培地中で洗滌した精製粗物から精製したタンパク質のTF/2N分子スペクトル(図6)は、オーハー半分に分離した尖端を示し、2つはおそらく未分離ショルダーを有する。

### ■1

ヒトトランスフェリン及び組み替えたトランスフェリンアミノ酸塩一分子のアミノ末端配列

タンパク質	アミノ酸配列	参考
ヒト血清	N-P-D-E-T-T-Q-K-C-A-T-S-	MacCallum
トランスフェリン		et al. (1983)
組み替えた	N-P-D-E-T-T-Q-K-C-A-T-S-	本報告
TF/2N (主要)		

組み替えたTF/2N (非主要)      P-P-B-K-T-T-  
TF/2N (主要)      トランスフェリン

\*組み替えたTF/2N配列は、Applied Biosystems 470A タンパク質シーケンサー上で決定した。約200 µmolの各試料を分析した。\*1.2 シーケンサーサイクルを分析した。\*サイクル9で残基は同定されなかった；しかし分析の前にシステイン残基は修飾もなかった。\*6シーケンサーサイクルを分析した。

組み替えたTF/2Nを用いることにより、いくつかの検査した基礎で制御してタンパク質分解により精製された粗と同一の構造を有するTF/2N分子を製造する。これは、この重要な技術はタンパク質の規則的活性形態の、安定な粗胞培養系における発現の初めての報告となる。

本文に記載のTF/2Nに差づくTF/2N濃度により、百万アスター不足細胞系又は冗長な耐候性標準を必要とせずに多量の組み替えたタンパク質が製造された。BHK細胞は経済的火腿豚成育に十分適しており、現在我々はバイオリアクター容器中の培养細胞の成育特性を試験中である。数リットルの容量を有する回転瓶又は充填塔のいずれかを用いることにより、従来都廉價のタンパク質を必要としてきたTF/2Nのような方法にさえ十分な組み替えたタンパク質を容易に製造することができる。

Polyacrylamide TF/2Nは、クレア-PAGE上の移動が主要形態より遅い(図3、パネルC)が、SDS-PAGE(図3、パネルB)上では同速度である。従って見掛けの分子量によってあるがTF/2N中の変性の相対的程度が異なる。タンパク質分解-洗滌アボートTF/2Nは6Mウレア中で

### 特表平7-502723 (9)

も移動の速い側を示すことに注意してほしい(図3、パネルC、部分A及びB)。

これらのデータでのヒトTTF/2NによるアルベドTTF/2Nの汚染及びその差は、TTF/Cの部分の状態、フレアゲル上における各各々のいくらかの損失、及びTTF/C試料の吐き上げの間の汚染液の希釈から生ずる。同一の斜率基配列(表1)は、シガナルペプチドが非主要及び主要形態の組み替えタンパク質の両方から除去されることを示す。ヒト血清からのヒトTTF/2Nの場合と同様に(Shine-back-Zinc, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 708-713)、組み替えヒトTTF/2Nは非-グリコニ化である。ヒトTTF/2Nの主要形態及び非主要形態の差の理由は現在未知である。非主要形態は合計の組み替えタンパク質の5%以上となりず、通常1%以下である。従って半分組み替えヒトTTF/2N(主要形態)の量は測定された。

組み替えヒトTTF/2Nの結合挙動、pI-NaDdSGe+FA-Gと並びレナード-Jones上の移動、ならびにプロトンNMRスペクトルは、オーキシシンを用いたタンパク質分解によるアミノ酸残基TTFペプチドから測定されたヒトTTF/2Nのものと、上記の点を除いて十分合致する(Shine-back-Zinc, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 708-713; Valeort, A. H. and Woodward, R. C. (1987) *Biochemistry*, 26: 8120-8125)。タンパク質分解により測定されたヒトTTF/2Nより主要形態の組み替えタンパク質は半分数位が高く(図3)、そのプロトンNMRスペクトルは類似

共鳴線を示す。非先端部の量はNMRによる分析には不十分であった。

E. coliからのアルカリホスファーゼ中のシガナルペプチドの挿入の以前の研究は、タンパク質中のシガナルペプチドを特異的に検査するための<sup>31</sup>P-NMRの有効性を確立した(Sykes, B. D., et al. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 469-473; Hudd, W. G. and Sykes, B. D. (1974) *Biochemistry*, 13: 3431-3437)。組み替えヒトTTF/2N中へのヒトP-チロシンの挿入により、この細胞培養液において選択的アミノ酸層が可能であり、シガナルペプチドの特異的NMRプローブへの方法を示すことが証明された。この結果は素-直換組み替え体に関して上記で記載した通り、非-修飾タンパク質とすべての点で同様に機能する。多量の挿入のためには細胞培養条件を最適化した場合、帯電性及び反応性金属を添加した時、及びpHを変化させた時の<sup>31</sup>P-NMRスペクトルの変化は、金属結合に特異的に含まれるシガナルペプチドの研究に有用であろう。選択的ジオーテリウム化した野菜アミノ酸の挿入は、日本ウズラからのサザチームに関する研究と同様の方法でタンパク質のプロトンNMRスペクトルの芳香基領域の分析を可能にするであろう(Brown-Mason, A. S. et al. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256: 1506-1509)。

II. カルボキシ末端発光器を含む組み替えトランスフェリン半分子の製造

TTFのカルボキシ末端発光器のコード配列を含むE. coli 制限フラグメントを、余長ヒトTTF-C末端から削除し、PCR-指示突然変異法

発の特徴を用いた(図2)。PCRプライマーとして用いるために2個のオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴ上は、Sma I 制限部位をコードし、もう1つは天然のシガナル配列をコードする配列が統合され、アミノ酸334-341のコード配列と合わさる配列が現れた。第2のオリゴヌクレオチドはヒトTTF-cDNAの5' 非翻訳領域の始動子と合わせり、正常な翻訳停止部位にSma I認識配列(3')を導入する。(Valeort, A. H. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 2752-2756)による番号付けを用いてヌクレオチド2125-2127)。Taqポリメラーゼ(park PCR-E1mix)を用いた2つのPCR増幅は、希望のDNAsフラグメントを每回、それはヒトTTFの天然のシガナル配列をC端由来コード配列にスプライシングする。このフラグメントをそのままSma Iで消化し、ヒトTTF/2N発現研究の場合と同様にNHEIの大Sma Iフラグメントを測定した。

#### III. 組み替え全長トランスフェリンの製造

ヒト血清トランスフェリンのためのコード配列を、上記のヒト前座ライブリヤから導入した全く異なるDNAsクリーンから説明した制限酵素消化フラグメントから得られた。最初のクリーンの終となるプラスミド(pK12-218)のエニーケ制限酵素認識部位の数が限られていたので、複数のベクター中にコード配列を導入するために一系列のクリーニング段階が必要であった。この過程は、cDNAの5'末端からのHpa II/Bam HI フラグメントのベクターpGIC18へのクリーニングにより開始された(Messing, J. (1983) *Molecular Biology*, 1: 191-200)。得られたプラスミドをE. coli

I及びE. coli LT1で消化し、ヒトトランスフェリンcDNAからのBam HI/Nhe Iカット<sup>32</sup>Pフラグメントを最初のフラグメントに接続してクローニングした。得られたプラスミドをその後E. coli LT1及びPst Iで消化し、トランスフェリン-cDNAの3'末端からの最終的Hind III/Pst Iフラグメントをクローニングし、全長コード配列の組み立てを完了した。N-族及びC末端トランスフェリンキー分子コード配列の場合に記載した通り、得られたプラスミドをSal I及びSph Iで消化すると、1個の制限フラグメントとして全長コード配列を放出し、残っているそれをT4-DNAポリメラーゼ及びDNase Iを用いて精製化し、その後NHEIの大Sma Iフラグメントにクローニングした(Palmiter, R. D. et al. (1987) *Cell*, 48: 435-448)。

プラスミドDNAはE. coli LT1 TM105から製造し、液体セシウム塩水勾配を用いた2道転送段階により粗製した。ベビーハムスター腎臓(EHFK)細胞を、1.0%の牛胎児血清を含むDulbeccoの修改Edsall培地-Ham's F-12培養液混合物(DMEM/Ham's F-12)(Cibco Sigma)中で100-mmの相当たり約1.0<sup>7</sup>細胞に底面し、残いでそれを洗浄し、P. F. (上) (1.5×5) MoL Cell. Biol. 8(1): 1480-1489に記載のリン酸カルシウム共沈法により1.0 mMのプラスミドを用いてトランスフェクションした。24時間後、培養を5.0 mg/mlのメトトレキサート(50 μg/ml)を含むDMEM-Ham's F-12に置き、プラスミド含有細胞を選択した。選択したら、EDTA (0.2 g/ml) を含むリン酸塩緩衝液を用い、細胞を約80%の濃度にて5倍の100 mM底面に、

置換突然変異体を指定する。例えば位置 6-3 のアスパラギン酸残基がセリン残基により置換された変異体は、6-3 と括弧で示される。

hTdT / 2N 変異体の製造は、2通りの方法で行った。D 6-1-S 置換体は Nelson, R. M. and Long, G. L. (1989) *Analyt. Biochem.*, 180: 147-151 の方法を用いて製造した。簡便な述べると、hTdT / 2N コード配列の 5' 末端から約 10 kDa の BamHI フラグメントを自己 C 18 中にサブクローニングし、その後 PCR によって既存突然変異体新規法の転写として使用した。得られた DNA フラグメントをその後 M 1 3 mp 18 中に再クローニングし、突然変異体新規法の配列をジテオキシ配列分析により確認した。その後フラグメントを、XbaI 及び BglII で消化することにより 2 本鎖形態の配列決定ベクターから放出し、最初の hTdT / 2N 置換体からの 5' エンド / 5' エンド フラグメントに連結して全長 D 6-1-S-hTdT / 2N コード配列を製造し、このスプライシングの忠実度を解離活性分析により確認し、その後前と同様に自己 C 18 中にクローニングした。

全 hTdT / 2N コード配列を M 1 3 mp 18 にサブクローニングし、その後それをオリゴアクリオチド一端式突然変異新規 (Zoller, H. J. and Smith, M. (1983) *Meth. Enzym.*, 100: 458-600) の転写として用い、自己 C 18 で消化後 (Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 82: 488-492) を用いることにより、置換突然変異体 D 6-3R, D 6-3C, K 206Q 及び K 207E を製造した。突然変異体の後、突然変異体配列のための全コード配列を、2

そのままの下へ 175 プラスコに、最後に 5 倍の広葉青黒麹菌 (それぞれ 2.0 g/ml) に供給に通された。T-175 通過の際に、フェノール水を含まない DCM-Et-T-1 の中のウレア濃度の代わりに血清蛋白質、Ureaase (Gibco) を 1% の量で用いた。

一度生存率が高くなると (約 10.0 mg/ml 極地)、Ureaase が G を含まない培地が少なくとも 2 回通過の際、組み替えたタンパク質の製造を維持できることが見いだされた。これは熟成された全一長鎖を替えてヒト胎児トランスクルタリニンの供給を非常に簡略化した。組み替えたタンパク質の削除のために、収穫した培養培地をフェニルメチカルボニルカーボド及びナトリウムアゲドに通して、0.1% とし、それぞれプロテアーゼ及びペクタリナーゼを加える。培地の体積を 1.0 ml に減少させ、組み替えたミノ酸組成ヒトトランスクルタリニン第一分子に関して記載したアミニオ酸交換カラム (Prolyaniline G.I., 1 x 1.0 cm) 上を通過させることにより精製する。上記参照。

算算された組み替えた全一長鎖ヒト胎児トランスクルタリニンはこのカラム上で、グリコシル化ペクターの密度によるいくらかの異質性を有す。タンパク質は N-acetyl-D-glucosamine 及びアラニンとドゲル導氣表面に關して単発熱であり、精製ヒト胎児トランスクルタリニンと同様のスペクトル及びスペクトル比を有する。

#### IV 突然変異体トランスクルタリニンの製造

野生型 (本家) の氨基酸の従来の單一文字アノマー符号、それに統一して一次配列中の置換の故優符号、(この場合改めタンパク質のパリソを位置 1 と指定する)、及びそれに続く置換段落の記号を用いることにより

5.0 bp 間隔でコード配列の長さに沿って順次接続した配列決定プライマーを用いたジテオキシ配列分析により確認した。その後所定のコード配列を、酵素消化により放出し、平滑化し、前記の名前と同様に挿入した。

a) 全一長鎖ヒト胎児トランスクルタリニン (hTdT) 及び b) アミノ-末端半分子 (hTdT / 2N) の種々の構成部位の突然変異体のための c) DNA を含む pNUDT プラスミドが構築された。これらの突然変異体は、1) ヒトメラノクラリニンの C-末端半分に見られる天端に起る突然変異に基づく K 6-3S, 2) 英国の人々からの hTdT の C-末端半分に見られる天端に起る突然変異に基づく G 6-5R, c) ニフトリの斯台からのオボトランスクルタリニン (oTdT) 中の C-末端半分の野生型突然変異に基づく K 206Q, d) ヒトクリトクラリニン (hCTdT) 中の野生型突然変異に基づく K 207S, 及び e) 組織結合部位の金属結合性を要する試みとしての D 6-3R を含む。これらの構造物はすべてペビーハムスター酵母細胞の安定な形質転換物中で、より 1.0 g/ml の組み替えたタンパク質の量で発現された。さらに oTdT のための全長 cDNA 及び hTdT / 2N- oTdT / 2N ならば oTdT / 2N- hTdT / 2N のためのキメラ cDNA を含む pNUDT プラスミドが構築された。

特定部位の突然変異体の性質には: D 6-3S 突然変異体は株と結合するが (文献中の接頭に反して) 野生型タンパク質よりもずっと弱やかであることが含まれる。例えばこの突然変異体は、GMP ウレアを含む AG 二重 helix における構造基盤にてその結合性を失うが、野生型はその結合性を保持している。可視スペクトルの最大は 422 nm あり、野生型の 470 nm と対照的である。G 6-5R 突然変異体は、野生型より株との

結合が弱く、470 nm に可視スペクトルの最大を有する。K 206Q 突然変異体は、そのモデルである hTdT / 2C と同様に野生型よりずっと強しく株と結合する。野生型株タンパク質の赤色は、それぞれ 1 mM のセリウム及び NTAA を含む 0.1 M 脱離酸缓冲液、pH 4.5、90 分で完全に急速に消えるが、突然変異体は全く色を失わず、その結合性を放出するためには 100 及び 1 mM のギフロキサンが必要である。アガ - 突然変異体は、株との両端が野生型タンパク質より遅いようである。この突然変異体の場合の可視スペクトルの最大は 460 nm にある。

全長組み替えた TdT は、S 1 リンケラーゼ A/G まで加熱・透析タンパク質と同速度で移動する。

#### 回旋散乱

当該技術における施設者は、本文に記載の検定の方法に関する多数の同様物を日常的実験のみを用いて認識する、又は確かめることができるであろう。そのような同様物は本明細の範囲内であり、以下の範囲に含まれると考えられる。

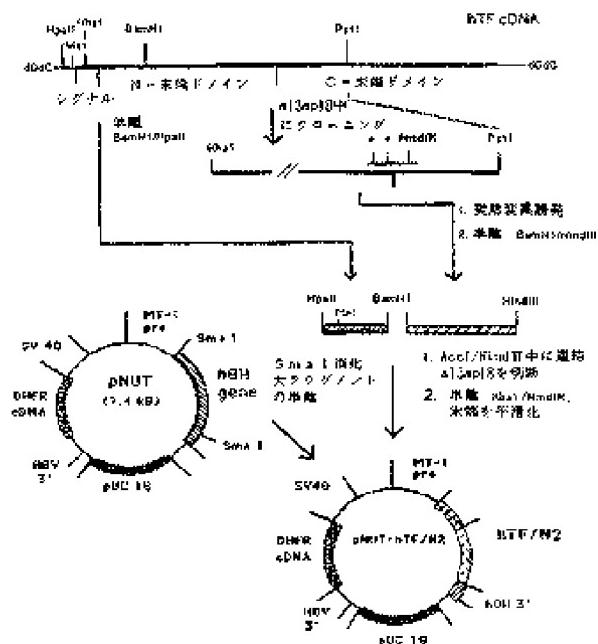


FIG. 1

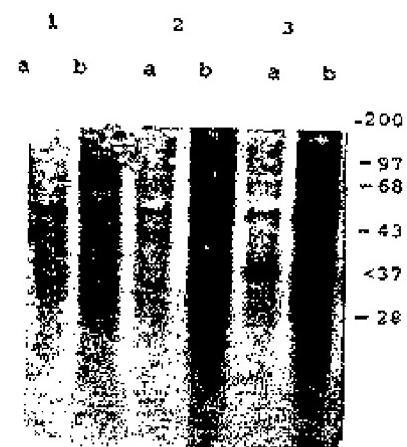


FIG. 2

FIG. 3A

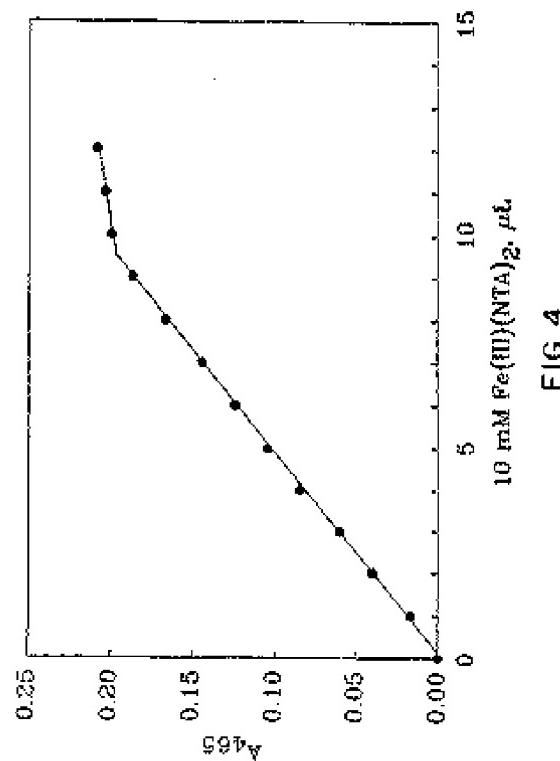
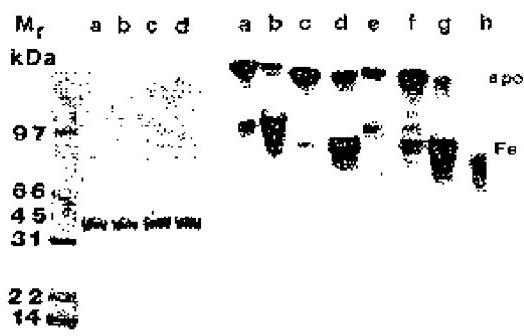
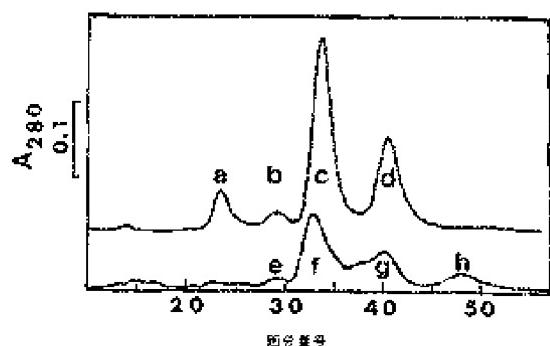


FIG. 4

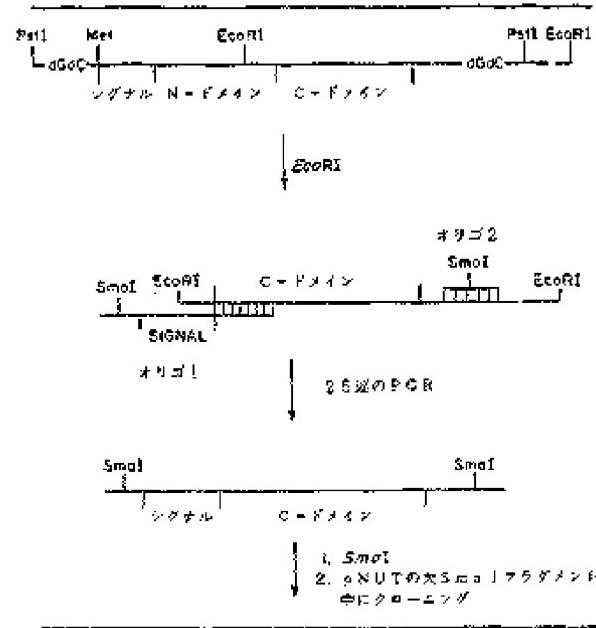
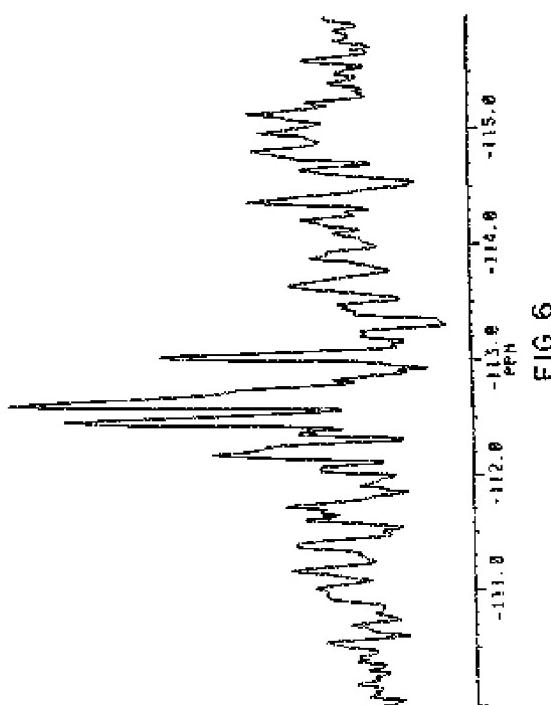
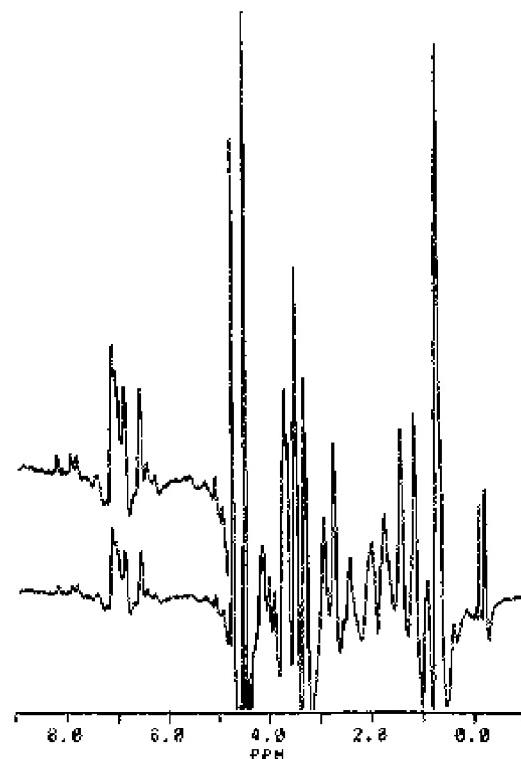
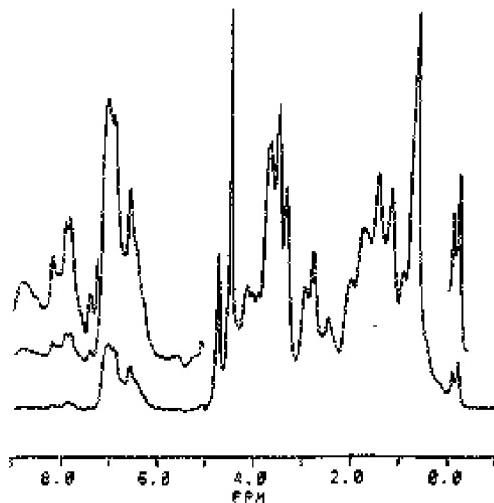


FIG. 7

開示書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成5年8月6日[記]

特許庁長官 廣 喜 順

## 1. 特許出願の要求

PCT/U.S.92/00928

## 2. 発明の名称

縮み苦えトランスフェリン、トランスフェリン半分子、  
及びそれらの类似変異体

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国バーモント州05405バーモント  
(盆地なし)名 称 デュニパークティ・オブ・バーモント・アンド・スティット・  
アグリカルチュラル・カレッジ (ほか1名)

## 4. 代理人 アイオフ

住所 東京都港区赤坂1丁目6番15号

日本自転車会社

氏名 (6078)井垣士 小尾嘉平吉

電話 33585-2256

## 5. 開示書の提出年月日

1993年5月4日

## 6. 提出書類の旨録

(1) 開示書の写し(翻訳文)

1項



治療的組成物。

9. 他の哺乳類タンパク質を含まない機能的活性哺乳類トランスフェリンの基本的な構造。

10. 他のヒト血清タンパク質を含まない既に組合ヒト血清トランスフェリンの基本的な構造。

11. a) トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を、トランスフェリンを発現させる条件下で培養し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収する装置を含む、複数の活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

12. ベクターがプラスミドDNAである、請求の範囲1上に記載の方法。

13. 真核細胞がペニームスター骨細胞である、請求の範囲1上に記載の方法。

14. a) トランスフェリンの翻譯可能プロモーターに作動的に結合した、トランスフェリン又はその一部をコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞を培養し、

b) プロモーターを誘導してトランスフェリンの発現を誘導し、

c) 発現されたトランスフェリンを回収する装置を含む、複数の活性哺乳類トランスフェリンの製造法。

15. プロモーターが翻譯可能マクロチオネインプロモーターである、請求の範囲14上に記載の方法。

16. a) 請求の範囲12に記載の発現ベクターを用いてトランスフェクションされた真核細胞をトランスフェリンを発現させる条件下で培養

E. 哺乳類トランスフェリンのアルノ末端を含む蛋白質とは別に基本的に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含む突出部を含む、複数的活性トランスフェリン半分子。

2. 少なくともトランスフェリンの1端の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まず、天然蛋白質が金属に対して天然の哺乳類トランスフェリンの結合力より強い結合力を有する、複数的活性天然蛋白質哺乳類トランスフェリン半分子。

3. 既に対しても天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を有する、請求の範囲1に記載の天然蛋白質トランスフェリン半分子。

4. 少なくともトランスフェリンの1端の突出部の金属-結合ドメインを含み、天然の哺乳類トランスフェリンの位置20位のリシン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲1に記載の天然蛋白質トランスフェリン半分子。

5. 少なくとも哺乳類トランスフェリンのカルボキシル末端を含むトランスフェリンの1端の突出部の金属-結合ドメインを含み、他の突出部の金属-結合ドメインを含まない哺乳類トランスフェリンの複数的活性半分子を金属の荷電量を基準以下に下げるのに十分な量で含む、金属キレート化治療で用いるための治療組成物。

6. 金属が銅である、請求の範囲1に記載の治療的組成物。

7. トランスフェリン半分子が天然のトランスフェリンより厳しく金属に結合する天然蛋白質である、請求の範囲1に記載の治療的組成物。

8. トランスフェリブ半分子が天然のトランスフェリンのリシン残基の代わりに位置20位にグルタミン残基を含む、請求の範囲1に記載の

し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収することにより製造された、基本的に他の哺乳類タンパク質を含まない複数的活性哺乳類トランスフェリン。

医患沟通手册

**PART II: INFORMATION CONCERNING INVENTIONS**

12. SPECIFICATED WHICH UNITS OF INVENTION WAS LOCATED  
IN THE FOLLOWING INVENTIONS AS FOLLOWS:

a. Claims 1, 2 and 14/15, drawn to transdermics and a method of therapy using  
transdermal classifiers in class 434.  
b. Claims 3/16, drawn to a heterologous recombinant vector and a transformant used  
therein, drawn to class 435/310.  
c. Claims 16, drawn to a dermatologic supplement for culture media, claim(s) 16  
claim(s) 16.

## フロントページの続き

(51) Int. CL. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 15/09	Z NA		
C 12 P 21/02	Z NA C 9282-4B		
//(C 12 N 15/09	Z NA		
C 12 R 1:91)			
(C 12 P 21/02			
C 12 R 1:91)			
	8412 -4B		
		C 12 N 5/00	B
		//( C 12 N 15/09	Z NA A
		C 12 R 1:91)	
(72)発明者 フアンク、 ウォルター・ディ アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・ アパートメント2202・オードリアロード 11931	(72)発明者 メイソン、 アン・ビー アメリカ合衆国バーモント州05445シャー ロツチ・ノースグリーンブツシユロード (番地なし)		
(72)発明者 マッギリブレイ、 ロス・ティ・エイ カナダ国ブイ6ティ 1ティ7・ブリティ ツシユコロンビア・バンクーバー・アリゾ ンロード2233・アパートメント807	(72)発明者 ウッドワース、 ロバート・シー アメリカ合衆国バーモント州05482シエル バーン・ローガンレイン4		